

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

⑫ 公開特許公報(A)

平1-312997

⑬ Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開 平成1年(1989)12月18日
C 12 P 19/14		A-8214-4B	
A 23 L 1/09		8114-4B	
C 13 K 1/02		8931-4B	
// A 23 L 1/10		H-8114-4B	審査請求 有 請求項の数 9 (全7頁)

⑮ 発明の名称 加水分解によってとうもろこし粒外皮から選択された単糖類を製造するためのコンビネーション方法

⑯ 特 願 昭63-139604

⑰ 出 願 昭63(1988)6月8日

⑱ 発 明 者 ブレイズ ジェイ. ア アメリカ合衆国, 60018 イリノイ, デス プレインズ, レナ ジャネット 1324番地
 ⑲ 発 明 者 ボール アレンザ アメリカ合衆国, 60018 イリノイ, デス プレインズ, フォリスト コープ ドライブ 1719番地
 ⑳ 出 願 人 ユーオービー インコ アメリカ合衆国, 60017-5017 イリノイ, デス プレインズ, イースト アルゴンクイン ロード 25番地
 ㉑ 代 理 人 弁理士 佐田 守雄 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

加水分解によってとうもろこし粒外皮から選択された単糖類を製造するためのコンビネーション方法

2. 特許請求の範囲

1. とうもろこし粒の外皮を、酸水解物が生成される条件下に強酸で加水分解し、酸水解物の少なくとも一部を、さらに加水分解される条件下にセルロース分解酵素と接触させ、しかる後、酵素による水解物を回収することを包含するとうもろこし粒外皮の加水分解法。
2. 前記の加水分解工程で使用される条件が、80～110℃の温度を含む請求項1記載の方法。
3. 酸水解物を単糖が主としてD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースである液体部分と、固体部分とに分離し、固体部分を酵素で加水分解して主としてD-グルコースを含有する酵素による水解物を生成させることをさらに特徴とする請求項2記載の方法。
4. 酸加水分解工程が35～80℃の温度を含む条

件で行われる請求項3記載の方法。

5. 酸水解物を単糖が主としてD-キシロース及びL-アラビノースである液体部分と、固体部分とに分離し、固体部分を酵素で加水分解して主としてD-グルコースを含有する酵素による水解物を生成させることをさらに特徴とする請求項4記載の方法。
6. 酵素がセルラーゼであり、酵素反応が約25～約55℃の温度及び約3～約6のpHで行われる請求項1記載の方法。
7. とうもろこし粒の外皮を、強塩基の希薄溶液と約10～約40℃の温度で混合し、塩基処理された外皮をセルロース分解酵素で加水分解し、しかる後、酵素による水解物の少なくとも一部を、強酸で酸加水分解し、得られた水解物を回収することを包含するとうもろこし粒外皮の加水分解法。
8. 酵素による水解物を単糖が主としてD-グルコースである液体部分と、個大部とに分離し、固体部分を酸加水分解して主としてD-グ

ルコース、D-キシロース及びL-アラビノースを含有する酸水解物を生成させることをさらに特徴とする請求項7記載の方法。

9. 酵素がセルラーゼであり、酵素による加水分解が約25～約55℃の温度及び約3～約6のpHで行われる請求項7記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

【発明の背景】

単糖類は一般に商業的に広い用途を有し、特にグルコースには様々な用途が見出されている。グルコースはエタノール製造用の発酵媒体の主基質として使用されるほか、甘味料として広く使用されるフラクトースにも異性化され、グルコース自体も甘みは砂糖の3/4程度ではあるが、甘味料として特に糖菓製品で使用されている。

グルコースの主たる源泉は、セロビオースの多糖類であるセルロースであって、セロビオースは β -D-グルコースが(1 \rightarrow 4)結合した二糖類である。合衆国ではとうもろこしの穂の鞘が腐

棄物として多量に得られるので、とうもろこしの穂鞘はセルロースの主たる供給源である。しかし、穂鞘の利用はこれにリグニンが含まれるために、必ずしも有利ではない。穂鞘はリグノセルロースの一種で、そこではセルロースが無定形リグニンとヘミセルロースのマトリックスに包まれている。リグニノセルロースの予備処理は、リグニンマトリックスを破壊してセルロースを加水分解しやすくする上で必要であり、プロセスも全体としてリグニノセルロースからリグニンを取り除く方向に向いている。脱リグニンの予備処理の不利は、リグニンの価値が比較的低いことと、脱リグニン工程からもたらされる化学的廃物を廃棄しなければならないことで助長される。

グルコース製造の背景では、より有効でより安価な脱リグニン法を開発するか、あるいは本質的にリグニンを含まないセルロース源を見つけることが極めて有益である。そのようなセルロース源は多量に入手できることが望ましく、

またセルロース製造に伴う副生成物になんらかの商業的価値があれば、そのセルロース源は廃棄物処理問題を殆ど伴わずに有効に使用することができる。我々はとうもろこし粒の粉砕工程での廃物であるとうもろこしの外皮に、そのセルロース源を見出した。とうもろこし粒の外皮はリグニンを全く、あるいは殆ど含んでいない。従って、とうもろこし粒の外皮は脱リグニンの予備処理なしに加水分解することができ、これによって主としてD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースを含む混合物を得ることができる。D-キシロースとL-アラビノースはペントースである単糖類であるが、これらはそれぞれある種の微生物の培養ないしは発酵媒体の成分としての用途を有しており、D-キシロースはまた染色及び紙にも使用されるので、加水分解から得られる全ての単糖類は、商業的な用途を有し、経済的に有利な条件を備えている。

加水分解剤でセルロースを入手するのに脱リグニンの予備処理を必要としないセルロース源

が豊富であることからもたらされる利益を認識することで、とうもろこし粒の外皮を単糖類の混合物に加水分解するテーマに幾つかの変形が見出された。その一つは酸加水分解を昇温下で行い、次いで酵素で加水分解することにより、グルコースと全単糖類を最大の収率で得るものである。第2の変形は低温で酸加水分解を行って、主としてヘミセルロールからの単糖類を含む溶液を得、次いで酵素による加水分解でセルロースをグルコースに分解するものである。第3の変形は中程度の塩基で予備処理した後、酵素でセルロースを加水分解して、単糖類が事実上グルコースだけの溶液を取得し、その後酸処理によってヘミセルロース成分を加水分解するものである。各々の変形は市場及び処理者の要請に応じてその使用を推奨し、テーマを特に調和の取れたものとする利点がある。各変形はまた、とうもろこし粒の外皮を原料として使用する方法の開発途上に発見されたユニークな特色を持っている。

【発明の概要】

本発明の目的は、脱リグニンの予備処理をなら必要とせず、しかも容易に多量に得られる物質から、D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースを製造する方法を開発することにある。その一つの態様は、昇温下でとうもろこし粒の外皮を酸で加水分解し、その加水分解物を次いで酵素で加水分解するものである。さらに特定の態様では、酸加水分解を約85～約110℃の温度で行う。他の態様では、とうもろこし粒の外皮を約75℃より低い温度で酸で加水分解して、別に回収できるペントースの混合物を得、次に酵素で加水分解して未加水分解のセルロースからグルコースを得るものである。さらに別の態様では、とうもろこし粒の外皮を中程度の塩基で予備処理し、次いで酵素による加水分解を施して、実質的に独占的単糖類としてグルコースを得、次にヘミセルロースと未反応のセルロース成分の酸加水分解を行うものである。

素による加水分解を受けやすくする程度に分裂させることも発見された。こうした発見を組合せることにより、ここに記載する幾つかの加水分解方法が提供される。

本発明の注目すべき特色の一つは、その融通性にあって、本発明の各方法はその実施者が市場の現状を考慮できる選択の自由度を有している。本発明の他の注目すべき特色は、前記選択の如何によって、単純な濾過以外に特別な分離工程を必要としないでも、単糖類の加水分解生成物をヘキソース流とペントース流に分離できることである。

本発明の第1の方法は第1図に示される。この方法ではとうもろこし粒外皮は約80～約110℃の範囲の温度で、強酸で連続的に加水分解され、次いで酸水解物はセルロース分解酵素で加水分解され、酵素による水解物が回収される。第1工程の酸加水分解で使用する強酸には、硫酸、塩酸、硝酸、非化水素酸、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸等が包含される。使用す

【発明の詳述】

本発明は幾つかの発見に基づいてなされたものである。とうもろこし粒の型式 砕工業からの基本的発見の一つは、とうもろこし粒の外皮が希どリグニンを含んでいないことである。典型的な分析結果によれば、とうもろこし粒外皮は約20%の澱粉と、約30%のセルロースと、約30%のヘミセルロースと、約10%の蛋白質を含有し、リグニン含量は5%以下である。従って、とうもろこし粒外皮は、セルロース及びヘミセルロース成分を加水分解するために、脱リグニンを必要としない点で、典型的なリグノセルロース類と異なる挙動をする。第2の発見は、とうもろこし粒外皮の酸加水分解に於いて、グルコースの収量が温度に依存するが、D-キシロース及びL-アラビノースのペントースの収量は、余り変化しないことである。このことは従来認識されていなかった水解物の量の調節を可能にする。比較的温和な塩基による予備処理は、とうもろこし粒外皮のセルロールの結晶性を、酵

る強酸の個々の特性は、その酸が反応条件下で酸化性の酸でない限り、重要ではない。典型的な酸濃度は約0.5～約15重量%の範囲で、さらに典型的には3～10重量%の範囲にある。

強酸での加水分解は約80～約110℃の範囲で行われる。最高温度は約110℃を越えると、水解物が目立って劣化することから規制される。最低温度はグルコース収量が温度依存性であり、低温に過ぎると、最大のグルコール生成を達成する上で異常に長い反応時間が必要になることから規制される。約95～約105℃の温度範囲が最適である。

酸加水分解からの反応生成物の少なくとも一部は、次いでセルロース分解酵素で処理され、未反応のセルロースは完全に加水分解される。酵素セスラーゼは約25～約55℃、好ましくは約35～50℃の間で通常使用される。一般に混合物は緩衝剤にてpH約3～約6に、より一般的には4.0～約5.0に維持される。酵素加水分解が完了すると、得られた水解物は回収されて製造者の

要求に応じて処理される。すなわち、グルコースはペントースから分離することができ、他の成分から、あるいはあるいは全水解から分離された単糖類は、さらなる処理を行わずに利用することができる。

第1図に示すように、酸加水分解からの反応生成物は液体部分と固体部分とに分けることができる。分離は膜分離又は単純な濾過のような通常的手段で行える。濾過分離が好ましく、これを実施する場合は、フィルターケーキを次に使用するまで、乾燥させないことが重要である。液体部分の単糖類は主として、D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースであり、この液体部分は、これを別に処理して一つ若しくはそれ以上の単糖類成分に分離、精製することができる。一方、固体部分は酵素による加水分解に供される。このから水解物が回収され、これには主としてD-グルコースが含まれる。

上記した固体分離工程は、グルコース収量を最大にする場合に好ましい。すなわち、強酸に

よる加水分解後、液体と固体を分離しない 合より、分離した 合の方が全グルコース収量が増大する。また、この分離は事実上D-グルコースのみを含有する酵素水解を、単一の可溶性単糖類として抽出するので、精製を容易にするものである。

第2図にフローを示す本発明の第2の方法は、酸加水分解を約80℃より低温度で行う点を除いて、酸と酵素による加水分解が連続する方法と同様である。比較的低温でとうもろこし粒外皮を酸加水分解すると、ペントースに富んだ混合物が抽出され、従って、高温では得られない選択性を得ることができる。上に述べた通り、第2の方法では酸加水分解が約80℃より低温度で、好ましくは約35～約70℃、さらに好ましくは約40～約60℃の範囲で行われる。使用できる酸とその濃度は前記したところと同じである。また、酸水解物をセルロース分解酵素で処理することも前と同様である。

第2図に示すように、酸水解物は液体部分と

固体部分とに分離することができる。既述したように、この分離は濾過又は膜分離のような通常的手段で行うことができるが、単純濾過が好ましい。液体部分は主にD-キシロース及びL-アラビノースである単糖類を主成分とし、若干の可溶性多糖類を含有する。固体部分は再度懸濁され、セルロース分解酵素による加水分解に供される。得られた水解物は単糖類としてD-グルコース主として含有する。

この固体分離は二つの生成物流を与える。酸水解物の分離から得られる液体部分は、主としてペントースと若干の可溶性多糖類を含有し、一方、酵素水解物は単糖類として主としてグルコースを含有する。従って、これは一方ではペントース間の手軽な分離を可能にし、他方でD-グルコースを抽出できる利点がある。しかし、固体分離工程を実施した場合には、恐らくは分離された水解物流の液体部分に若干の多糖類が溶解するため、全グルコース収量が減少することを理解する必要がある。

第3図に示される他の方法では、とうもろこし粒外皮は強塩基の希薄溶液と約10～約40℃の温度で混合され、次いでまずセルロース分解酵素で加水分解され、しかる後、強酸で加水分解されて水解物が回収される。塩基による予備処理の目的は、セルロースの結晶性を減少させて酵素で加水分解しやすくすることにある。

この塩基による予備処理は、リグノセルロース物質に対する同様な処理に比較して並外れて温和である。塩基の個々の特性は重要ではなく、アルカリ金属の水酸化物及び炭酸塩が好適に使用される。水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸リチウム及びこれらの混合物は、約0.5～約5%、通常は約0.5～約3%の濃度で使用して適当な塩基の例である。塩基による予備処理は約10～約40℃で、通常は約15～約30℃の間の温度で、前記した目的が達成されるに十分な時間行われる。塩基による予備処理時間は、とうもろこし粒外皮と塩基との接触効率、温度、

塩基の濃度等によって変化するが、典型的には約15～約180分の範囲にある。

塩基で予備処理された物質は、濾過されることなく、前述した条件下にセルロース分解酵素を使用する加水分解に供される。酵素水解は次いで前述したような強酸で加水分解され、最終生成物流を得る。

第1及び第2の方法と同様、この第3の方法でも酵素水解物を液体部分と固定部分に分離する工程を備えている。膜分離乃至は単純濾過等のような分離方法で得られる液体部分は、事実上単一の単糖類としてD-グルコースと若干の可溶性多糖類を含有する。従って、この分離工程を使用すると、比較的純粋なD-グルコース流を得ることができる。

固体部分は強酸で加水分解され、主としてD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースを含有する糖水解物を与える。しかし、分離工程の液体部分に若干の多糖類が溶解するため、単糖類の全収量は酵素水解物に分離を施さない

合より少なく、収量を最大にすることが重要である。合には、この分離は得策でない。

下記の実施例は本発明を単に説明するものであり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

実施例1

大手のコーン粉砕業者から排出物として得られるとうもろこし粒外皮15gを、7%硫酸200mlと温度を変えて5.5～6.0時間混合した。次いで反応混合物を冷却して濾過し、フィルターケーキを約100mlの水で洗浄した。フィルターケーキは出発物質の約25重量%であった。このフィルターケーキをHPLCにより、グルコース、キシロース及びアラビノースについて分析し、表1に示す結果を得た。

(以下余白)

表1：酸加水分解での温度の影響

時間, hr	5.5	6	6	5.5
温度, °C	100	85	70	60
水解物				
生成水解物重量%				
グルコース	28.8	24.9	12.3	3.3
キシロース	14.8	13.6	14.4	8.3
アラビノース	10.3	9.0	10.3	11.6

上記の結果はグルコースの生成の程度が温度依存性であることを示している。70～100℃の間では、キシロース及びアラビノースの量は温度の影響を受けないようである。60℃及びそれ以下の温度では、キシロースの収量が減少する。

実施例2

とうもろこし粒外皮を7%の硫酸100℃で5.5時間加水分解した。実験Aでは酸水解物を濾過し、フィルターケーキを濾液に加えた洗液で洗浄して乾燥し、酢酸塩緩衝液(0.1モル, pH4.5)に再分散し、0.4%セルラーゼにて45℃で24時間

加水分解した。実験Bでは酸水解物を濾過し、フィルターケーキを濾液に加えた洗液で洗浄し、次いでフィルターケーキを乾燥することなく酢酸塩緩衝液に再分散した。この分散液を実験Aのように酵素で加水分解した。実験Cでは酸水解物を濾過する代わりにpH4.5に調整した後、前記のように酢酸塩緩衝液を添加し、この混合物を酵素で処理した。実験結果を表2に示す。

(以下余白)

表2:昇温下の加水分解

実験	試料	酵母 グルコース	酵母 グルコース	キシロース	アラビノース	全 グルコース
A	酵母分解物からの 濾液		26.9	14.9	10.5	
	セルラーゼ 水分解物	1.2				28.1
B	酵母分解物からの 濾液		25.0(25.5) ^a	18.6(14.8)	9.7(10.5)	
	セルラーゼ 水分解物	14.0				39.5
C	酵母分解物		23.5	13.7	9.8	
	セルラーゼ 水分解物	^b 8.8				32.3

a. () の数値は2回目の実験値を示す。
b. 数値はグルコース生成の増加量を示す。
c. 単糖類についての数値は使用した外皮基準の重量パーセントである。

表2の結果は、グルコース量を最大にするためには酵母分解物の濾過が必要であるが、フィルターケーキは酵母による加水分解前に乾燥すべきでないことを示している。

実施例3

乾燥したとうもろこし粒外皮14.9gと、7%硫酸200mlとの混合物を60℃で5.5時間加熱した。冷却した混合物を濾過し、フィルターケーキを約100mlの水で洗浄した。洗液と濾液を混合して分析したところ、これには最初の外皮の重量基準でグルコースが2.5%、キシロースが8.4%、アラビノールが10.1%含まれていた。

フィルターケーキを約250mlの蒸留水に分散させてそのpHを4.8に調整した。pH4.8の酢酸塩緩衝液(1モル、30ml)と1.2gのセルラーゼを添加した後、容量を300mlに調整した。この混合物を振り混ぜながら24時間45℃に保温した後、濾過し、外皮重量の9.8%に相当するフィルターケーキを得た。濾液を分析したところ、これは最初の外皮重量基準で17.4%のグルコースを含

有し、他の単糖類は1%以下であった。

実施例4

とうもろこし粒外皮の試料を1.5%の水酸化ナトリウム溶液(外皮5g当り塩基75ml)と、環境温度で約90分間混合した。この混合物をpH4.6に調整し、このpHで酢酸塩緩衝液を0.1モルの濃度になるよう添加し、この混合物を45℃で24時間0.4%(w/v)のセルラーゼで処理した。実験Aでは酵母分解物を濾過し、濾液に加えた洗液で洗浄して得たフィルターケーキを実施例3と同様、100℃で酸加水分解した。実験Bでは酵母分解物を濾過することなく、そのすべてを上記のように酸加水分解に供した。実験結果を表3に示すが、単糖類は使用した外皮基準の重量%で与えられている。

(以下余白)

表3:とうもろこし粒外皮の緩和な酵母分解

実験	試料	酵母 グルコース	酵母 グルコース	キシロース	アラビノース	全 グルコース
A	酵母分解物からの 濾液	34				
	濾液		0.6	1.3	0.7	34.6
B	酵母分解物 濾液	34	5	17.5	10.5	39

a. 数値は単糖類生成の増加量を示す。

表3の結果は、溫和な塩基で処理したとうもろこし粒外皮を酵素で加水分解すると、比較的高い純度のグルコースが得られることを示している。また、単糖類の生成を最大にするためには、酵素で処理された物質を酸加水分解前に濾過すべきでないことを示している。さらに、他のデータによれば、濾液を酵素で処理するだけなら、グルコースの収量は濾過しない場合の34%から15%に減少するので、最初に塩基で処理された物質は、酵素による加水分解前に濾過すべきでないことも示している。

分離工程を経て酸加水分解する場合のフローを示す。

特許出願人

ユーオービー

インコーポレイテッド

代理人弁理士

佐田守雄 外1名



4. 図面の簡単な説明

第1図はとうもろこし粒外皮を80℃以上の温度で強酸にて加水分解し、任意的な分離工程を経て酵素で加水分解する場合のフローを示す。

第2図はとうもろこし粒外皮を80℃以下の温度で強酸にて加水分解し、任意的な分離工程を経て酵素で加水分解する場合のフローを示す。

第3図はとうもろこし粒外皮を溫和な塩基で予備処理後、まず酵素で加水分解し、任意的な

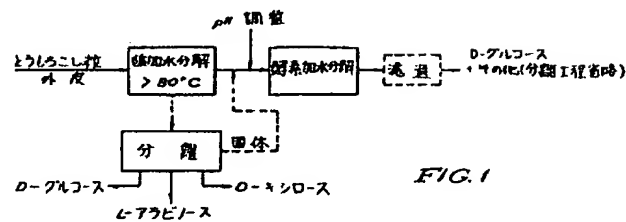


FIG. 1

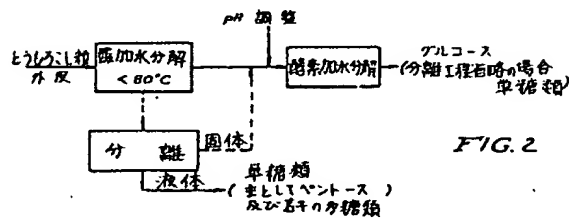


FIG. 2

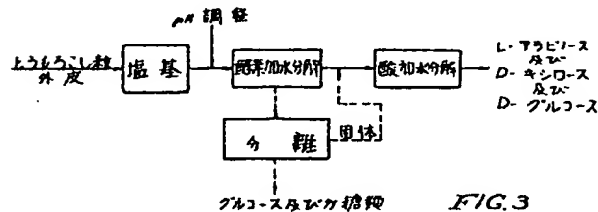


FIG. 3